



Caractérisation d'inhibiteurs potentiels des NO-synthases

Sandra Pijaud, Olivier Bottin, Rémy Kouoi, Virginie Berthat, Valérie
Besson, Emmanuel Curis, Dorota Desaulle, Dominique Lerouet

► To cite this version:

Sandra Pijaud, Olivier Bottin, Rémy Kouoi, Virginie Berthat, Valérie Besson, et al.. Caractérisation d'inhibiteurs potentiels des NO-synthases. *Acta discipulorum academiae medicamentariae artis*, 2016, UE LC 9 Cas pratiques d'analyses de données expérimentales, 1, pp.1 - 5. hal-01379539

HAL Id: hal-01379539

<https://hal.science/hal-01379539>

Submitted on 13 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Caractérisation d'inhibiteurs potentiels des NO-synthases

Étudiants : Sandra PIJEAUD, Olivier BOTTIN, Rémy KOUOI

Enseignants : Virginie BERTHAT, Valérie BESSON, Emmanuel CURIS, Dorota DESAULLE, Dominique LEROUET

Résumé

Parmi les mécanismes physiopathologiques du traumatisme crânien figure notamment la voie du monoxyde d'azote (NO), principalement produit par les NO-synthases de type 1 (NOS1) et 2 (NOS2). Le monoxyde d'azote forme des peroxynitrites, qui entraînent diverses altérations fonctionnelles au niveau cérébral. Alors qu'il n'existe aucun traitement préventif des complications du traumatisme crânien, une stratégie thérapeutique potentiellement intéressante serait d'inhiber les NO-synthases.

Dans cette étude, nous avons étudié deux molécules inhibitrices des NOS1 et NOS2 : l'ARL17477 et le 1400W. L'activité catalytique des NO-synthases a été étudiée à l'aide d'un dosage radio-enzymatique. En utilisant un modèle de régression non linéaire, nous pouvons conclure que l'ARL17477 est un inhibiteur sélectif de la NOS1 et le 1400W un inhibiteur sélectif de la NOS2.

Mots-clés : Traumatisme crânien, NOS, ARL17477, 1400W

Introduction

Le traumatisme crânien, figurant parmi les premières causes de handicap dans le monde (avec une incidence de 2 personnes pour 1000), ne possède à l'heure actuelle aucun traitement permettant de protéger les patients des lésions cérébrales induites. Diverses études ont pu montrer que l'inhibition des enzymes synthétisant le monoxyde d'azote, les NO-synthases, pouvait avoir un effet neuroprotecteur, et pouvait donc constituer une stratégie de traitement intéressante [1], [2].

En effet, à côté des lésions mécaniques qu'un traumatisme crânien peut infliger au cerveau, coexiste toute une cascade biochimique complexe, avec notamment une libération excessive de glutamate, principal neuromédiateur excitotoxique, qui, en activant les récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (NDMA), va entraîner une entrée de calcium dans les cellules neuronales. Le calcium, entre autres actions, va activer les NO-synthases dépendantes du calcium, ce qui va entraîner une production de monoxyde d'azote (NO). Quand cette production de NO a lieu conjointement à une augmentation d'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ induite par une lésion, cela peut rapidement conduire à la formation de peroxynitrites ($ONOO^-$) [3], une espèce oxydante particulièrement réactive, impliquée dans les dégâts oxydatifs post-traumatiques dans le cerveau du fait de réactions avec les acides aminés des protéines, de peroxydation des lipides et d'altérations de l'ADN (figure 1) [4]. De plus, les peroxynitrites activent également les calpaïnes [5] (figure 1), protéases qui, suractivées, entraînent des lésions axonales et neuronales, par protéolyse de composants du cytosquelette.

La NO-synthase (NOS) permet de synthétiser, à partir de la L-arginine, le monoxyde d'azote, molécule gazeuse ayant des actions très nombreuses dans l'ensemble de l'organisme (neurotransmetteur, vasodilatateur...). Cette enzyme existe sous 3 isoformes, chacune ayant un rôle important à la fois

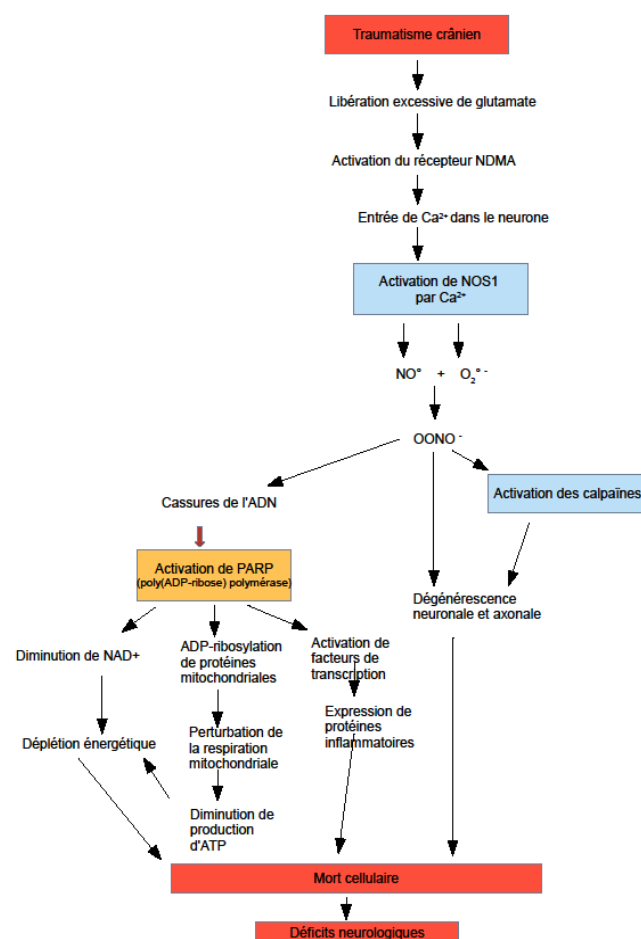


Figure 1 : Principe du mécanisme physiologique lors du traumatisme crânien

physiologiquement et physiopathologiquement dans le cas du traumatisme crânien : NOS1, NOS2 et NOS3.

La NOS1 (NOS neuronale ou *nNOS*), dont l'activité dépend du calcium, est exprimée principalement dans les cellules neuronales. Le NO produit par cette isoenzyme a un rôle important de neurotransmetteur associé à la plasticité neuronale, la mémoire, la régulation du flux sanguin cérébral, la

transmission de la douleur... Elle a été désignée par certaines études comme la principale isoenzyme responsable de la neurotoxicité du NO. [4]

La NOS2 (NOS inductible ou *iNOS*), dont l'activité ne dépend pas du calcium, inductible, est exprimée notamment dans les macrophages, les cellules gliales et les cellules tumorales en réponse à des cytokines proinflammatoires ou des endotoxines. Elle peut produire 100 à 1000 fois plus de NO que les autres isoformes, du fait qu'elle soit indépendante du calcium. Le rôle de la NOS2 dans la neurotoxicité est assez controversé, les diverses équipes s'étant penchées sur le sujet ayant montré des résultats contradictoires [6].

La NOS3 (NOS endothéliale ou *eNOS*), dont l'activité dépend du calcium, est exprimée surtout par les cellules de l'endothélium vasculaire et dans le plexus choroïde. Le NO produit par cette isoenzyme joue un rôle dans le maintien de la microcirculation cérébrale, en inhibant l'agrégation plaquettaire, l'adhésion des leucocytes et leur migration et en réduisant la prolifération des cellules musculaires lisses. La NOS3 aurait plutôt un effet neuroprotecteur.

Du fait de ce rôle délétère des NO-synthases dans le traumatisme crânien, on s'intéresse ici à deux molécules, qui avaient déjà montré des résultats intéressants dans d'autres études :

- l'ARL17477, que certaines études ont montré être un inhibiteur sélectif de la NOS1, a montré chez l'animal des résultats significatifs sur la protection des dégâts cellulaires provoqués par l'ischémie [1] ;
- le 1400W (N-[3-(aminométhyl)benzyl]-acétamide), que certaines études ont montré comme étant un inhibiteur sélectif de la NOS2. [7].

L'objectif de cette étude est d'étudier les propriétés inhibitrices de ces deux molécules candidates, en réalisant des courbes d'inhibition de l'activité de l'activité NO-synthase.

Méthodes

Détermination de l'activité catalytique de la NOS1 et de la NOS2 à concentrations croissantes des inhibiteurs.

Les activités catalytiques des NO-synthases ont été mesurées par une méthode radio-enzymatique [8], reposant sur la conversion de la L-[¹⁴C]-arginine en L-[¹⁴C]-citrulline, réaction catalysée par les NO-synthases (figure 2).

Pour mesurer l'activité catalytique de la NOS1, neuronale et constitutive, à différentes concentrations d'inhibiteurs, des échantillons de cervelets de 6 rats ont été utilisés car ce tissu est riche en NOS1 [9]. Dans ce tissu, l'activité NOS dépendante du calcium est principalement due à la NOS1 et l'activité de la NOS3 est considérée comme négligeable. Ces échantillons de cervelet ont été homogénéisés dans un tampon froid (A) contenant entre autres de l'EGTA afin de chélater le calcium endogène. Ils ont ensuite été centrifugés à

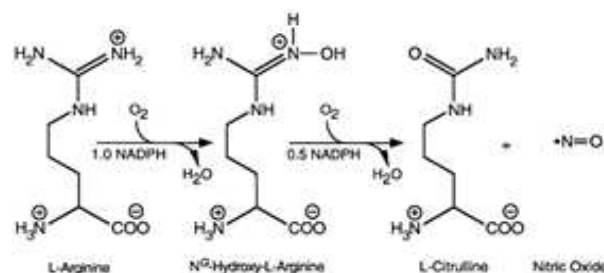


Figure 2 : Réaction de conversion de la L-arginine en L-citrulline catalysée par les NO-synthases

20 000 g à 4 °C. Les surnageants ont ensuite été passés dans des colonnes échangeuses de cations afin d'éliminer l'arginine endogène (chargée positivement). Ils ont ensuite été incubés pendant 30 minutes à 37 °C avec un mélange réactionnel (B) contenant du NADPH, de la tétrahydrobioptérine, un cofacteur de la NOS, et de la L-[¹⁴C]-arginine. Le milieu B contient également, dans la moitié des tubes, du CaCl₂, afin de mesurer l'activité NOS totale ; les tubes sans calcium permettent de mesurer l'activité de la NOS2. L'activité spécifique de la NOS1 s'obtiendra alors en soustrayant à l'activité NOS totale l'activité spécifique de la NOS2. L'incubation est réalisée en présence de concentrations croissantes soit de l'inhibiteur 1400W (de 0 à 600 μM), soit de l'inhibiteur ARL17477 (de 0 à 50 μM). La réaction est arrêtée par l'ajout d'1 mL de tampon froid et les échantillons sont passés dans des colonnes échangeuses de cations afin d'éliminer la L-[¹⁴C]-arginine résiduelle puis les colonnes sont éluées. La quantité de L-[¹⁴C]-citrulline formée est mesurée à l'aide d'un détecteur à scintillation et elle est rapportée au temps d'incubation et à la masse totale de protéines de l'échantillon. La concentration en protéines des échantillons est déterminée par la méthode de Bradford (qui consiste en un dosage colorimétrique fondé sur un changement d'absorbance mesuré à 595 nm), en utilisant comme étalon l'albumine sérique bovine. Multiplier cette concentration par le volume total de l'échantillon donne la masse totale de protéines de l'échantillon. L'activité catalytique des NO-synthases correspond aux picomoles de L-[¹⁴C]-citrulline formée par milligramme de protéine et par minute.

Pour mesurer l'activité catalytique de la NOS2, inductible, à différentes concentrations d'inhibiteurs, les échantillons utilisés sont 6 poumons de rats après induction d'une endotoxémie par une injection intrapéritonéale de lipopolysaccharides entraînant une cascade de médiateurs pro-inflammatoires et une forte induction de la NOS2 [10]. Les échantillons de poumons sont ensuite traités de la même manière que les échantillons de cervelet avec cette fois un temps d'incubation de 45 minutes et sans apport de calcium dans le mélange réactionnel (B), ce qui permet la détermination de l'activité spécifique de la NOS2.

Les données sont exprimées en pourcentages d'inhibition, obtenus à partir de l'activité de la NOS1 et de la NOS2 dans les échantillons contenant une concentration nulle d'inhibiteurs (activité maximale) et de celle dans les échantillons mis en présence des inhibiteurs ARL17477 et 1400W.

Analyse statistique

La relation entre l'inhibition de l'activité enzymatique (I) et la concentration d'inhibiteur (C) est représentée par l'équation de Hill dans sa forme sigmoïde :

$$I = I_{\min} + \frac{I_{\max} - I_{\min}}{1 + e^{-\gamma \ln(\frac{C}{C_{50}})}}$$

où I_{\min} représente l'inhibition minimale de l'activité enzymatique, I_{\max} son inhibition maximale, C_{50} la concentration produisant la moitié de l'inhibition maximale possible et γ est le coefficient de Hill. Ce modèle a été ajusté par la méthode des moindres carrés non-linéaires. Les valeurs initiales des paramètres ont été déterminées par un modèle approché : I_{\min} a été approchée par la moyenne des valeurs d'inhibition des 3 concentrations les plus faibles, I_{\max} par celle des inhibitions des 3 concentrations les plus fortes, C_{50} et γ par régression linéaire après transformation logistique :

$$\ln\left(\frac{I - I_{\min}}{I_{\max} - I}\right) = \gamma \ln C - \gamma \ln C_{50}$$

Les paramètres du modèle ont été considérés significativement différents de zéro pour un degré de signification, p , inférieur à 0,05 selon le test de Wald associé. Les intervalles de confiances à 95 % ont ensuite été déterminés par la méthode de la vraisemblance profilée.

Les analyses statistiques de ces données ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 3.1.2).

Résultats

L'ensemble des paramètres d'inhibition est présenté dans le tableau 1.

Activité inhibitrice

Les courbes d'inhibition de la NOS1 (figure 3) suggèrent une inhibition plus marquée par l'ARL17477 que par le 1400W. En effet, la C_{50} de l'ARL17477 est nettement inférieure à celle du 1400W (tableau 1) ; dans les deux cas, à forte concentration, l'inhibition maximale (I_{\max}) est atteinte (tableau 1).

Les courbes d'inhibition de la NOS2 (figure 4) montrent aussi une inhibition quasi-totale par les deux molécules, mais avec une efficacité évoluant en sens contraire : 1400W possède une C_{50} plus faible qu'ARL17477 (tableau 1).

Sélectivité de l'ARL17477

La comparaison des courbes d'inhibition pour les NO-synthases de type 1 et 2 (figure 5) montre qu'ARL17477 inhibe la NOS1 à de plus faibles concentrations que la NOS2 (le rapport des C_{50} vaut environ 21), mais pour les deux l'inhibition est quasi-complète (I_{\max} est voisin de 1).

Sélectivité du 1400W

La comparaison des courbes d'inhibition pour les NO-synthases de type 1 et 2 (figure 6) montre que 1400W inhibe la NOS2 à des concentrations bien plus faibles que la NOS1 (le rapport des C_{50} vaut environ 44), mais pour les deux enzymes l'inhibition est quasi-complète (I_{\max} est voisin de 1).

Discussion

Cette étude a permis d'étudier les propriétés inhibitrices de l'ARL17477 et du 1400W sur la NOS1 et la NOS2. L'ARL17477 est un inhibiteur de la NOS1 plus puissant que le 1400W, mais aussi efficace puisque tous deux inhibent totalement la NOS1. En revanche, le 1400W est un inhibiteur de la NOS2 légèrement plus puissant que l'ARL17477, mais là encore tous deux permettent une inhibition complète.

La comparaison des C_{50} de chaque produit pour les deux isoformes suggère que l'ARL17477 est un inhibiteur sélectif de la NOS1 (sa C_{50} est 21 fois plus faible pour elle que pour la NOS2), mais son efficacité est la même. Cela est dû à la perte de sélectivité à forte concentration. D'autres travaux, qui ont comparé son activité sur la NOS1 avec celle d'autres inhibiteurs de la

Tableau 1 : Paramètres d'inhibition des NOS1 et NOS2 par 1400W et ARL17477

Valeurs déterminées par régression non linéaire, avec leur intervalle de confiance à 95 % obtenu par profilage.

		I_{\min}	I_{\max}	C_{50} (μmol/L)	γ
ARL17477	NOS1	0,181 [0,004 ; 0,287]	1,025 [0,964 ; 1,120]	0,029 [0,012 ; 0,054]	0,628 [0,384 ; 0,962]
	NOS2	0,081 [0,030 ; 0,129]	0,997 [0,951 ; 1,053]	0,602 [0,493 ; 0,736]	1,146 [0,903 ; 1,464]
1400W	NOS1	0,013 [0,000 ; 0,084]	0,996 [0,923 ; 1,090]	17,12 [12,95 ; 22,58]	1,182 [0,671 ; 0,962]
	NOS2	0,045 [0,004 ; 0,083]	0,982 [0,947 ; 1,018]	0,389 [0,330 ; 0,458]	1,318 [1,082 ; 1,618]

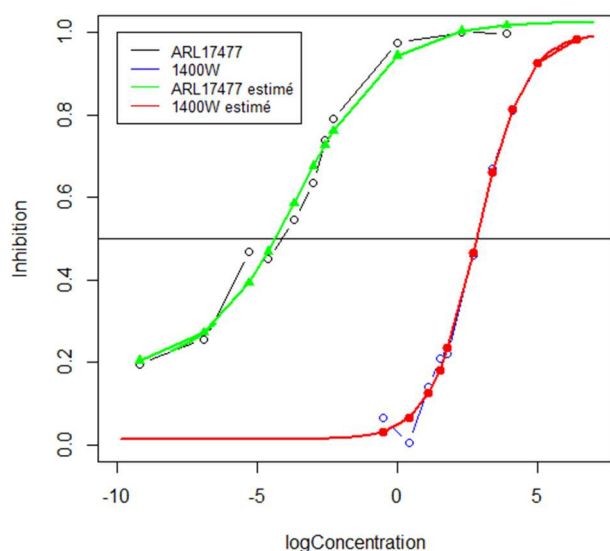


Figure 3 : Courbe d'inhibition de la NOS1 par le 1400W et l'ARL17477

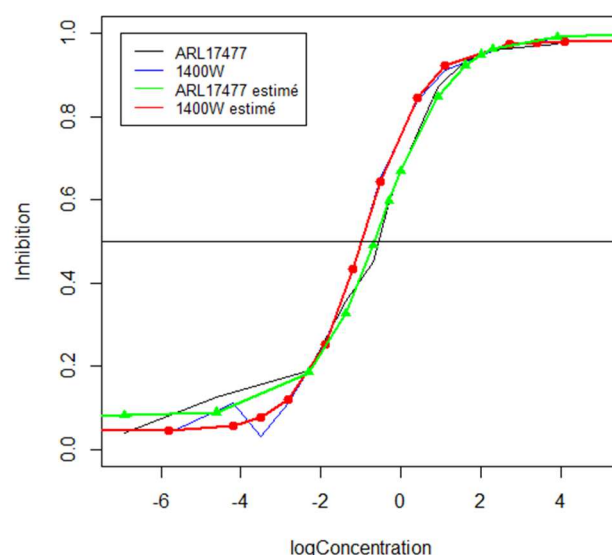


Figure 4 : Courbe d'inhibition de la NOS2 par le 1400W et l'ARL17477

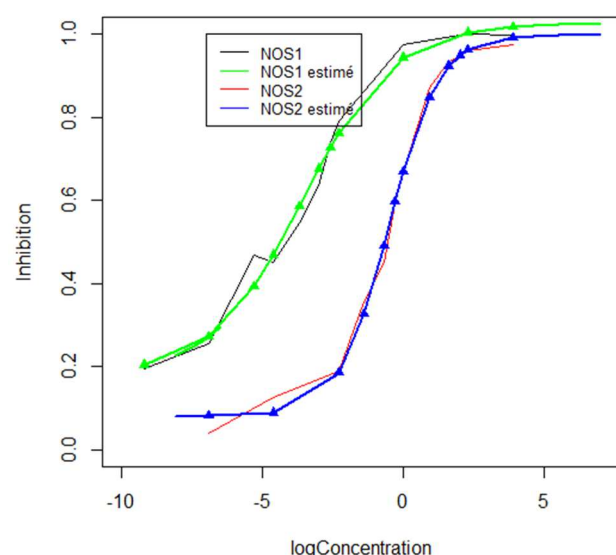


Figure 5 : Courbe d'inhibition des deux NOS par l'ARL17477

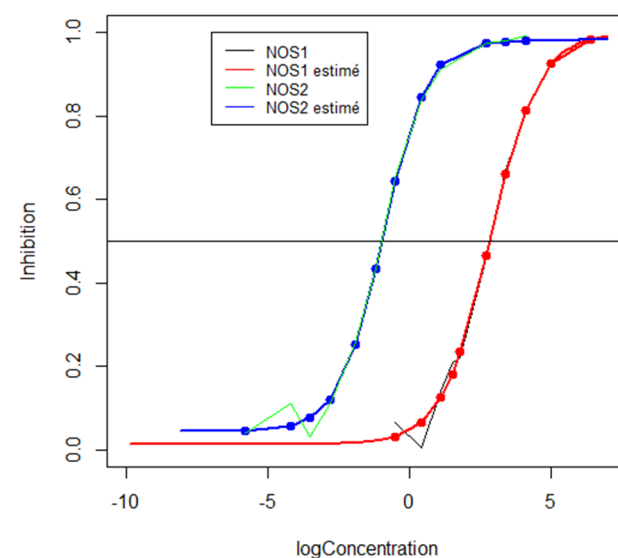


Figure 6 : Courbe d'inhibition des deux NOS par le 1400W

NOS1 [1] ont montré qu'il était l'un des inhibiteurs les plus puissants et sélectifs de la NOS1.

Au contraire, le 1400W est 44 fois plus sélectif pour la NOS2 que pour la NOS1, bien que là encore l'efficacité soit semblable, de par la perte de sélectivité à forte concentration. Les études le comparant à d'autres inhibiteurs de la NOS2 et celles étudiant son action dans des modèles traumatisés crâniens [2,7,11] ont montré qu'il était l'inhibiteur avec la meilleure sélectivité.

Lors du traumatisme crânien, au cours duquel la libération de monoxyde d'azote va exercer un rétrocontrôle positif sur la libération de glutamate [12], il va y avoir une augmentation de l'entrée de calcium et la suractivation de la NOS1 qui va entraîner une neurotoxicité en provoquant des lésions cérébrales. L'inhibition de la NOS1 pourrait permettre de limiter

ces lésions cérébrales, suggérant l'idée d'une stratégie d'inhibition de la NOS1 chez les traumatisés crâniens. Pour vérifier cet effet neuroprotecteur à la suite de traumatismes cérébraux, différentes études ont été menées sur des modèles animaux d'ischémies cérébrales [2]. Une équipe a ainsi exploré l'inhibition de la NOS1 par l'ARL17477. Elle a montré que l'ARL17477, avec une fenêtre d'action de 2 h au-delà de laquelle il est inefficace, s'il est administré en post-occlusion dans des modèles animaux d'ischémie cérébrale focale, pourrait néanmoins représenter une stratégie thérapeutique [1]. Une étude a aussi démontré son action synergique avec des antagonistes des récepteurs AMPA et NMDA [13] au cours de la prise en charge du traumatisme crânien.

D'autre part, de nombreuses études réalisées sur l'action du 1400W [2,7,14] ont démontré une diminution des lésions cérébrales à la suite de la baisse

d'activité de la NOS2. Cependant, une étude [8] a démontré que la NOS2 n'intervient pas toujours lors du traumatisme crânien. Une stratégie d'inhibition de NOS2 ne représente donc pas nécessairement une stratégie thérapeutique intéressante pour traiter le traumatisme crânien.

Dans l'exploration de stratégies thérapeutiques pour les traumatismes crâniens, la réduction des lésions a surtout été le paramètre étudié, mais il ne rend pas vraiment compte de l'amélioration des capacités cérébrales, qui est la finalité recherchée.

En conclusion, nous avons démontré les propriétés inhibitrices de l'ARL17477 et du 1400W sur

la NOS1 et la NOS2. Tous deux ont permis de réduire leur activité, bien que nous remarquons que l'ARL17477 est un inhibiteur sélectif de la NOS1 par rapport à la NOS2 et le 1400W, un inhibiteur sélectif de la NOS2 par rapport à la NOS1. L'inhibition de la NOS1 par l'ARL17477 pourrait représenter alors une stratégie thérapeutique pour traiter le traumatisme crânien. Il serait intéressant de poursuivre sur des études pré-cliniques afin de déterminer le contexte le plus favorable pour son utilisation ou d'essayer de rechercher d'autres molécules inhibitrices de la NOS1, sur le modèle de l'ARL17477, pouvant être plus puissantes, afin de traiter le traumatisme crânien.

Bibliographie

- [1] M. J. O'NEILL et coll. « ARL 17477, a selective nitric oxide synthase inhibitor, with neuroprotective effects in animal models of global and focal cerebral ischaemia ». *Brain Research*, juillet **2000**, vol. 871 n°2, p. 234-244.
- [2] S. PARMENTIER et coll. « Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents ischaemic brain injury ». *British Journal of Pharmacology*, mai **1999**, vol. 127 n°2, p. 546-552.
- [3] E. D. HALL et coll. « Relationship of nitric oxide synthase induction to peroxynitrite-mediated oxidative damage during the first week after experimental traumatic brain injury », *Exp. Neurol.*, décembre **2012**, vol. 238 n°2, p. 176-182.
- [4] Valérie C. BESSON. « Drug targets for traumatic brain injury from poly(ADP-ribose)-polymerase pathway modulation », *British Journal of Pharmacology*, juillet **2009**, vol. 157 n°5, p. 695-704.
- [5] M. KHAN et coll. « Targeting the nNOS/peroxynitrite/calpain system to confer neuroprotection and aid functional recovery in a mouse model of TBI ». *Brain Research*, janvier **2016**, vol. 1630, p. 159-170.
- [6] G. LOUIN et coll. « Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces neurological deficit but not cerebral edema following traumatic brain injury », *Neuropharmacology*, février **2006**, vol. 50 n°2, p. 182-190.
- [7] Mehrnaz Jafarian-TEHRANI et coll. « 1400W, a potent selective inducible NOS inhibitor, improves histopathological outcome following traumatic brain injury in rats », *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.*, mars **2005**, vol. 12 n°2, p. 61-69.
- [8] Dominique LEROUET et coll. « Lack of iNOS induction in a severe model of transient focal cerebral ischemia in rats », *Exp. Neurol.*, septembre **2005**, vol. 195 n°1, p. 218-228.
- [9] M. J. ELIASSON et coll. « Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.*, avril **1997**, vol. 94 n°7, p. 3396-3401.
- [10] M. GRANDATI et coll. « Calcium-independent NO-synthase activity and nitrites/nitrates production in transient focal cerebral ischaemia in mice ». *British Journal of Pharmacology*, octobre **1997**, vol. 122 n°4, p. 625-630.
- [11] A. NEMEC et coll. « Systemic use of selective iNOS inhibitor 1400W or non-selective NOS inhibitor L-NAME differently affects systemic nitric oxide formation after oral *Porphyromonas gingivalis* inoculation in mice », *Arch. Oral Biol.*, juillet **2010**, vol. 55 n°7, p. 509-514.
- [12] F. X. GUIX et coll. « The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain ». *Prog. Neurobiol.*, juin **2005**, vol. 76 n°2, p. 126-152.
- [13] C. A. HICKS et coll. « Synergistic neuroprotective effects by combining an NMDA or AMPA receptor antagonist with nitric oxide synthase inhibitors in global cerebral ischaemia ». *European Journal of Pharmacology*, septembre **1999**, vol. 381 n°2-3, p. 113-119.
- [14] F. J. PÉREZ-ASENSIO et coll. « Inhibition of iNOS activity by 1400W decreases glutamate release and ameliorates stroke outcome after experimental ischemia ». *Neurobiol. Dis.*, mars **2005**, vol. 18 n°2, p. 375-384.